



Rec'd PCT 10 15 APR 2005

Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

REC'D 09 MAR 2004
WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: INV. IND.

N. RM2002A000525 DEL 15.10.2002



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto supraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, 11 MAR 2004

IL DIRIGENTE

Ing. Giovanni De Sanctis

Giovanni De Sanctis

BEST AVAILABLE COPY

UFFICIALE, ROGAN

NUMERO DOMANDA _____

REG. A

DATA DI DEPOSITO _____

NUMERO BREVETTO _____

DATA DI DEPOSITO _____

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

RM 2002 A 0005 25

SHARDNA SPA

Viale Trento n. 39 - 09123 CAGLIARI - IT

D. TITOLO **MEZZI DIAGNOSTICI E TERAPEUTICI PER PATOLOGIE CORRELATE ALLA CALCOLOSI RENALE.**

Classe proposta (scz./cl./scil) _____

(gruppo/sottogruppo) _____

L. RIASSUNTO

E' descritto un acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene ZNF365 umano o la proteina ZNF365 o porzioni funzionali di essa per uso diagnostico o terapeutico di patologie correlate alla calcolosi renale. Sono descritti anche opportuni kit diagnostici.

M. DISEGNO



DESCRIZIONE

RM 2002 A 000525

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale a titolo:

"Mezzi diagnostici e terapeutici per patologie correlate alla calcolosi renale"

a nome: SHARDNA S.p.A.

Inventori: Mario Pirastu, Fernando Gianfrancesco, Teresa Esposito,
Maria Neve Ombra

La presente invenzione concerne mezzi diagnostici e terapeutici per patologie correlate a calcolosi renale.

La nefrolitiasi è una patologia multifattoriale comune di eziologia ignota, caratterizzata dalla presenza di calcoli nel tratto urinario, con una forte componente genetica (Jaeger 1996; Curhan et al. 1997; Baggio 1999; Scheinman 1999). I calcoli renali colpiscono circa il 10% della popolazione (Serio and Fraioli 1999; Rivers et al. 2000). I calcoli possono essere di ossalato di calcio, di fosfato di calcio, di acido urico, di struvite, e di cistina. La nefrolitiasi da acido urico (UAN) riguarda circa il 20% di tutti i calcoli; si ha quando l'urina diventa troppo concentrata e l'acido urico può complessarsi, formando piccoli cristalli e poi calcoli. Le basi molecolari del metabolismo dell'urato nel rene umano non sono completamente chiare.

Gli autori dell'invenzione avevano già identificato un locus di circa 2.5 cM, potenzialmente correlato con la calcolosi renale da acido urico (UAN), sul cromosoma 10q21-q22 in pazienti di un piccolo paese della Sardegna (Ombra et al. 2001). Tuttavia il locus non può essere

utilizzato per alcun saggio di "screening" su popolazione, né per la messa a punto di saggi diagnostici, né per la definizione di agenti terapeutici. Resta pertanto essenziale identificare la regione genica correlata con la patologia.

Per identificare la regione genica gli autori hanno esteso l'analisi ad un campione più grande di soggetti affetti prescelti nello stesso gruppo. Utilizzando metodi che si basano sulla condivisione di alleli e/o aplotipi identica per discesa o sull'autozigosità è stato identificato un blocco di linkage disequilibrium (LD) di circa 200 kb nella popolazione di Talana e una regione minima di 67 kb associata con la calcolosi (UAN). Gli autori hanno identificato nella regione associata un nuovo gene, denominato *ZNF365*, come esso sia diviso in 15 esoni estendendosi su una regione genomica di circa 300 kb generando almeno quattro proteine diverse di 407, 333, 462 e 216 amminoacidi. La sequenza codificante per l'isoforma proteica di 216 amminoacidi risulta completamente inserita nella regione associata di 67 kb. La proteina ha almeno un dominio transmembrana, e diversi siti per la N e O-glicosilazione a N-terminale, suggerendo che possa essere una proteina di membrana. Un'analisi mutazionale ha mostrato come una mutazione di un nucleotide codificante, causante un missenso nell'esone 12 (Ala62Thr) è fortemente associata alla UAN (valore $p=0.0096$). Inoltre la proteina variante ha una struttura secondaria diversa, e potrebbe essere coinvolta nella eziologia della UAN.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene *ZNF365* umano

in cui il frammento codifica per una porzione funzionale di almeno una delle proteine del gruppo ZNF365 per uso diagnostico di patologie correlate alla calcolosi renale.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene *ZNF365* umano in cui il frammento codifica per una porzione funzionale di almeno una delle proteine del gruppo ZNF365 per uso terapeutico di patologie correlate alla calcolosi renale.

E' ulteriore oggetto dell'invenzione un metodo per evidenziare in un soggetto almeno una mutazione nel gene codificante per una delle proteine del gruppo ZNF365 umano, localizzato sul cromosoma 10, comprendente le fasi di:

- prelevare un campione contenente una quantità sufficiente di DNA da detto soggetto o in grado di essere riprodotto in coltura;
- isolare il DNA dal campione prelevato;
- sottoporre il DNA isolato ad amplificazione esponenziale utilizzando come coppia di inneschi per la reazione di amplificazione almeno due oligonucleotidi in grado di amplificare almeno un frammento del gene *ZNF365* umano, in cui il frammento codifica per una porzione funzionale di almeno una delle proteine del gruppo ZNF365;
- evidenziare in almeno un frammento amplificato eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale.

Preferibilmente la fase di amplificazione esponenziale del DNA viene effettuata utilizzando coppie di inneschi in grado di amplificare una parte della porzione codificante del gene *ZNF365* umano. Più

preferibilmente la fase di amplificazione esponenziale del DNA per amplificare una parte della porzione codificata del gene *ZNF365* umano comprende l'uso delle seguenti coppie di inneschi:

Ala62Thr-F: 5' CTC CAC TCC ACC TTT TTA AG 3'

Ala62Thr-R: 5' GCT GAC ATT GGT ACT TAC TG 3'.

Sempre più preferibilmente la fase di evidenziare in almeno un frammento amplificato eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale avviene per sequenza diretta. L'esperto del settore intenderà che metodi alternativi rientrano ugualmente nell'ambito di protezione dell'invenzione.

Costituisce ulteriore oggetto dell'invenzione un kit diagnostico per patologie correlate alla calcolosi renale comprendente:

- almeno una coppia di oligonucleotidi innesco per la reazione di amplificazione esponenziale di almeno un frammento del gene *ZNF365* umano, in cui il frammento codifica per una porzione funzionale di almeno una delle proteine del gruppo *ZNF365*;
- un DNA di controllo da soggetto non affetto da patologie correlate alla calcolosi renale.

Preferibilmente le coppie di oligonucleotidi innesco del kit per la reazione di amplificazione sono in grado di amplificare una parte della regione codificante del gene *ZNF365*.

Costituisce ulteriore oggetto dell'invenzione una proteina appartenente al gruppo delle proteine *ZNF365* o porzione funzionale di essa per uso diagnostico di patologie correlate alla calcolosi renale.



Costituisce ulteriore oggetto dell'invenzione una proteina appartenente al gruppo delle proteine ZNF365 o porzione funzionale di essa per uso terapeutico di patologie correlate alla calcolosi renale.

L'invenzione verrà ora descritta in suoi esempi non limitativi, con riferimento alle seguenti figure:

Figura 1 Mappa fisica e trascrizionale della regione critica del UAN. I marcatori della mappa fisica sono indicati verticalmente sopra le linee che rappresentano il DNA genomico. I microsatelliti usati nell'analisi di linkage sono D10S1719, D10S1652 e D10S1640. Tutti i geni e le sequenze EST localizzate in questa regione sono mostrati.

Figura 2. Mappa degli SNPs del blocco LD.

Figura 3. Struttura genomica del gene *ZNF365* che mostra sia i siti di splicing che un sito di inizio alternativo, che generano quattro diversi trascritti. I codoni di inizio (ATG) e di stop (TAA or TGA) sono mostrati per tutte le isoforme. Due diversi promotori, l'isola CpG (P1) una TATA box (P2) sono indicati da frecce. Gli esoni usati per ciascun trascritto sono indicati in riquadri colorati, mentre il blocco LD è in grigio. Le due varianti missenso trovate negli esoni 5 e 12 sono mostrate.

Figura 4. Correlazioni tra le sequenze amminoacidiche delle proteine ZNF365. I riquadri grigi indicano identità di amminoacidi. Le linee continue indicano il dominio zinc finger C2H2 e i segmenti coiled-coil. I domini transmembrana sono mostrati nel rettangolo.

Figura 5. Risultati degli studi di associazione. In alto sono indicati i marcatori molecolari usati nello studio. La posizione sulla mappa fisica e i risultati di associazione sono indicati per ognuno di

essi. In basso sono riportate le differenti configurazioni di aplotipi associati.

Figura 6. Predizioni della struttura secondaria con SecStr. Le strutture più probabili, individuate con tre o più metodi, sono in nero negli istogrammi. (A) Predizione strutturale per l'allele non associato (ala 62). (B) Predizione strutturale per l'allele imputato della nefrolitiasi da acido urico (thr62).

Soggetti e metodi

Collezione dei campioni

Gli individui dello studio derivano da un villaggio isolato (Talana) della Sardegna centrale, di 1.200 abitanti, caratterizzato da una crescita lenta della popolazione, alta endogamia, e elevata consanguineità (Wright et al. 1999; Angius et al. 2001). La diagnosi di UAN era clinicamente confermata da un accurato esame medico e da ecografia renale. La lista originaria di pazienti era di 134 soggetti affetti. Per questo studio sono stati selezionati 62 pazienti (età media=58.4 anni) con UAN grave. Sono stati identificati 94 soggetti di controllo, per ecografia. Tutti i soggetti hanno dato un consenso informato e i campioni sono stati prelevati in accordo alla dichiarazione di Helsinki.

Genotipizzazione degli SNP

Per trovare SNPs comuni nella regione critica per UAN, è stato effettuato un allineamento di sequenze genomiche, depositate in database pubblici con il programma Sequencher. Il pannello includeva 10 persone della popolazione di Talana non imparentate. Ampliconi di PCR di 800-1000 nt contenenti i polimorfismi putativi sono stati

selezionati con il programma Oligo 4.0. Le reazioni di PCR sono state preparate usando 50 ng di DNA genomico stampo, 0.5 μ M di ciascun innesco per PCR, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM di ciascun dNTP, 0.5 U *Taq* polimerasi e il tampone consigliato dalla casa produttrice (Amersham) in un volume finale di 25 μ l. La PCR prevedeva un passaggio singolo di denaturazione per 2 min a 94°C, seguito da 35 cicli di denaturazione per 30 sec a 94°C, annealing per 30 sec alla temperatura di denaturazione (T_M) e estensione a 72°C per 45 sec. Un passaggio finale è stato effettuato per 7 min a 72°C.

I campioni sono stati poi sequenziati con il Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystem), con un 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems) per 25 cicli di 95°C per 10 sec, T_M per 5 sec e 60°C per 2 min. Dopo la sequenza, ciascuna reazione è stata precipitata con isopropanolo. La sequenza è stata effettuata su ABI prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). I polimorfismi sono stati evidenziati da allineamenti multipli delle sequenze usando il programma Autoassembler (Applied Biosystems).

E' stata effettuata un'analisi mutazionale di tutti i 15 esoni del gene identificato ZNF365 per PCR, comprese le regioni di confine introne/esone.

La genotipizzazione dei singoli polimorfismi nucleotidici è stata effettuata per ibridazione dot-blot dei prodotti di PCR, comprendenti i polimorfismi, con corti oligonucleotidi allele-specifici (sonde ASO) (Ristaldi et al. 1989).

Cloni di cDNA

ZNF365A (KIAA0844 accession number AB020651; <http://www.kazusa.or.jp/huge/>) è stato ottenuto da Kazusa DNA Research Institute. La sequenza di cDNA di *ZNF365B* è stata ottenuta sequenziando i cloni di cDNA 3069791 e 4821260 da IMAGE Consortium. Le sequenze di cDNA *ZNF365C* e *ZNF365D* sono state ottenute per RT-PCR/vettore TOPO (Invitrogen) usando coppie di inneschi in differenti esoni del gene su RNA da rene umano (Clontech), e mediante la strategia 5'- e 3'-RACE utilizzando il kit di cDNA di rene umano Marathon-Ready.

Studi di espressione di RNA

Un Northern blot da tessuti multipli umani (Clontech) è stato ibridizzato con i trascritti *ZNF365A*, *B*, *C* e *D*. Il Northern blot è stato preibridizzato, ibridizzato e lavato secondo le istruzioni (Clontech).

Analisi RT-PCR: 0.5 μ g di mRNA da rene umano (Clontech), ghiandola adrenalinica (Clontech) e sangue sono stati retrotrascritti in una miscela di reazione di 50 μ l contenente tampone 1x RT (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$), 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP, 0.2 μ g di esameri casuali (Roche), e 200 unità di trascrittasi inversa SuperScript (Invitrogen). Dopo 60 min di incubazione a 37°C, 1 μ g di RNasi DNase-free è stata aggiunta e incubata per 10 min a 37°C. Il cDNA formato è stato estratto due volte con fenolo/cloroformio/iso-amilalcol (25:24:1). Il cDNA è stato poi precipitato per la notte con 1/10 vol di 3 M acetato di sodio, pH 5.2, e 2.5 vol di etanolo. 10 ng di ciascun cDNA è stato utilizzato come stampo in una reazione di PCR di 25 μ l con tampone 1x PCR (Amersham), 0.2mM dNTPs, 0.5 unità AmpliTaq polimerasi



(Amersham), e 0.5 μ M di ciascuna sequenza innesco derivata dal cDNA. Usando un DNA Thermal Cycler 9700 (Applied Biosystems), sono stati effettuati 40 cicli di amplificazione usando: 30 sec a 94°C; 30 sec a TM; e 45 sec a 72°C.

La RACE 5' e 3' è stata effettuata usando 5 μ l of cDNA da rene umano Marathon (Clontech), tampone 1x PCR (Amersham), 0.2mM dNTPs, 1:0 unità di AmpliTaq polimerasi (Amersham), e 0.5 μ M degli inneschi gene-specifico e AP1 (Clontech) in un volume finale of 50 μ l. 25 cicli di amplificazione sono stati effettuati usando: 30 sec a 94°C; 20 sec a TM; e 4 min a 68°C. PCR nested sono state effettuate con lo stesso protocollo delle prime PCR usando 1/250 delle prime PCR, inneschi gene specifici 2 e AP2 (Clontech) in un volume finale di 50 μ l. 30 cicli di amplificazione sono stati effettuati a 30 sec a 94°C; 20 sec a TM; e 4 min a 68°C. Aliquote delle prime e seconde reazioni PCR con diversi inneschi, sono state corse su gel di agarosio e trasferite su membrana di Nylon (Amersham). Le membrane erano ibridate con un prodotto PCR includente gli esoni 2, 3, 4 e 5 del trascritto *ZNF365D*. I prodotti positivi per PCR sono stati clonati in TOPO-vector (Invitrogen) e sequenziati con inneschi M13 forward e reverse.

RISULTATI

Mappa trascrizionale del locus UAN

E' stata ottenuta una sequenza genomica consensus della regione di 1.1 Mb, corrispondente all'intervallo critico di 2.5, per allineamento di sequenze parziali depositate in diversi database. E' stato determinato che la regione di 1.1 Mb contiene almeno 6 nuovi geni non caratterizzati

(Figura 1). Il gene per *MRF-2* (modulator recognition factor 2) è codificato da 10 esoni per una regione di circa 200 kb. Questo gene è ortologo al gene *Desrt* di topo. Mutanti omozigoti di questo gene sono ritardati nello sviluppo e sessualmente, con anomalie immuni transitorie (Lahoud et al. 2001). Il gene *RTKN-L* (rhotekin like) è un omologo del gene *RTKN*, un inibitore dell'attività GTPasica di rho localizzata sul cromosoma 2 (Fu et al. 2000). *RTKN-L* consiste di almeno 10 esoni per una regione di 75 kb. Per la loro funzione questi due geni non erano ovvi candidati della nefrolitiasi da acido urico. La sequenza EST 603251916F1 (GenBank Acc. BI603606) fa parte del cluster genico UniGene Hs.252954. Usando la sequenza di mRNA più lunga di questo cluster UniGene, è stato trovato che questo gene è diviso in almeno cinque esoni per una regione di 50 kb. La sequenza EST hd42c05.x1 (GenBank Acc. AW511012) non ha alcuna similarità significativa con EST depositate in database, suggerendo come questo gene sia presente a livelli molto bassi in cellule umane. Il cDNA *KIAA0844* è derivato dal database di proteine HUGE (Nagase et al. 2000). Infine la EST 603040095F1 (GenBank Acc. BI822044) codifica per cinque esoni distribuiti su una regione genomica di 15 kb. In assenza di un'attribuzione funzionale, non è possibile individuare quale di questi 4 geni sia coinvolto nella nefrolitiasi da acido urico, sebbene l'ultima EST, sia la più vicina al marcatore D10S1652 già associato alla UAN.

Caratterizzazione molecolare del gene per la UAN

Tutti i geni descritti ad eccezione di EST 603040095F1 erano localizzati fuori del blocco di linkage disequilibrium e pertanto nessuno di essi è stato analizzato ulteriormente. Per caratterizzare le regioni al 5' e 3' di questo gene, sono state utilizzate strategie RT-PCR e RACE partendo dalla regione codificante della EST 603040095F1. E' stato possibile quindi individuare un gene comprendente una regione genomica di 300 kb sovrappoentesi al blocco LD. Un'analisi comparativa delle sequenze genomiche e di cDNA ha portato ad identificare che il gene consiste di 15 esoni e include la EST 603040095F1 nella regione critica (delimitata da AFM214zb6) e *KIAA0844* al di fuori (Figura 1). Nel rene umano per un complesso sistema di splicing e siti di inizio della trascrizione alternativi si generano diverse proteine di 407, 333, 462 e 216 amminoacidi (Figura 3; Tabella 1).

Tabella 1

Esone	(bp)	Giunzioni Esone-Introne	Introne	(bp)
1	264	gagcaagggtGTTCCTCCGCG...AACAAGTCGGgtaagaggcg	1	1721
2	756	ccccctccagGACTTTTAGA...GGAAAGAAGagtaagtgttg	2	11459
3	181	tgccttgcagAGAAGTTGTC...CGGGCACGTGgtgagtcacc	3	10160
4	38	tttccttcagCTTACAGACA...CCAAATGCCTgtatgtatgt	4	750
5	2920	ccctctgtagAAGCCGAGGG...AGCTGTTAAGaattcctgct	5	57322
6	57	ttcctttcagAGCTGGAAAG...GGAATTGGAGgtaaagccac	6	20079
7	413	ttatgactagGAGTCTGCGA...TGAGTAATTTatattattaag	7	40174
8	150	agctttgtaaGAAGAGGAAG...CTCCATAACCgtaagaaata	8	102482
9	148	ttgttttttagATTTTGGCC...GCTACTGCAGgtgaatactc	9	20497
10	222	tatttttacagGAATTGGCCC...CTGTCTCCAGgtaaattccc	10	10880

11	88	attattctagGTGCTGGAAT...CAAAAACAAGgtaagtcagt	11	436
12	265	ttccacaaagTCAACACATC...TCAATTCAAGgtcatttttg	12	764
13	91	tctgttttcagGATTTAGCCA...ACTTTGAGAGgtgggtgtcc	13	9642
14	74	atctctgcagAGAAAGTGTC...TGTGTGATTGgtaagaattt	14	4006
15	1805	gtcttcatagGCAAATTGAC...TACACAGTGTatacagtttt		

Trascritto ZNF365A - KIAA0844 (4158 bp) è codificato da 5 esoni e la sua regione promotore putativa contiene un'isola CpG. La regione a cornice di lettura aperta (ORF) di 1224 bp codifica una proteina di 407 amminoacidi con un peso molecolare di 46558 Da. La regione N-terminale di questa proteina (aa 26-51) ha il classico zinc finger domain della famiglia C2H2 (Figura 4). Questo dominio è comune a proteine che legano acidi nucleici, ma anche utilizzato in interazioni proteina-proteina e associazioni alla membrana (Laity et al. 2001). Il gene è stato denominato *ZNF365A* (zinc finger protein 365) secondo la HUGO Gene Nomenclature Committee. Una predizione della struttura secondaria di questa proteina suggerisce la presenza di quattro domini alfa-elica coiled-coil frequentemente usato come motivo di oligomerizzazione.



Trascritto ZNF365B – Questo trascritto di 1671 bp è stato identificato per analisi di EST (EST associate sono 602688686F1 e UI-H-BW1-amf-e-12-0-UI.s1) e, come *ZNF365A*, è localizzato fuori della regione critica. A differenza di *ZNF365A*, il trascritto utilizza esoni 4 e 5 diversi (Figura 3). La proteina codificata di 333 amminoacidi è identica alla proteina *ZNF365A* nella regione N-terminale (esoni 1-3) contenente

il dominio zinc finger e i segmenti coiled-coil, ma divergente al C-terminale (Figura 4).

Trascritto ZNF365C - *ZNF365C* è stato isolato per analisi di RT-PCR usando diverse combinazioni di inneschi ancorati in diversi esoni del gene. Questo trascritto di 3376 bp si sovrappone alla regione critica. Usa i primi 4 esoni e lo stesso promotore del trascritto *ZNF365B* fuori della regione critica, e 4 diversi esoni (9,13,14 e 15) localizzati nel blocco LD (Figura 3). La proteina codificata di 462 amminoacidi è simile alla proteina *ZNF365B* ma con un diverso C-terminal. Un'analisi bioinformatica di questa isoforma basata sulla predizione di domini transmembrana rivelava la presenza di almeno due domini di membrana in questa nuova regione C-terminale dall'aa 344 a 395, suggerendo che essa potrebbe essere una proteina integrale di membrana (Figura 4).

Trascritto ZNF365D - *ZNF365D* comprende una regione genomica di circa 150 kb e usa un suo specifico promotore (TATA-box). Tutti gli esoni codificanti di questo trascritto sono contenuti nel blocco LD associato con UAN (Figura 3). Il cDNA completo è stato ottenuto mediante 5'e 3' RACE. La sequenza composta di cDNA di 2695 bp codifica una proteina di 216 amminoacidi completamente diversa dalle proteine codificate da *ZNF365A* e *B*, ma identica nella regione C-terminale alla proteina *ZNF365C* (Figura 4). Un'analisi di predizione rivelava un forte dominio transmembrana alle posizioni 126-149 suggerendo che, come *ZNF365C*, potrebbe essere una proteina integrale di membrana con la regione N-terminale al di fuori della

cellula.. In questa porzione non citosolica erano presenti diversi potenziali siti di modificazione, inclusi siti di glicosilazione N e O-linked (Asn-20, Asn-82, Thr-88, Thr-89, Ser-90, Ser-91, Ser-93, Thr-97) suggerendo che questa porzione esterna della proteina di membrana sia glicosilata. Inoltre parecchi residui di cisteina che possano partecipare alla formazione di ponti disolfuro, sono stati identificati alle posizioni 14, 27, 112, 113, 142, 183, e 207. Infine sono stati identificati tre possibili siti per la protein chinasi C, a Ser-163, Ser-165, Ser-167 al C-terminale (Figura 4). Questi ultimi potrebbero essere localizzati intracellularmente.

Le isoforme proteiche di 407, 333, 462 e 216 amminoacidi non hanno alcuna omologia significativa per altre proteine depositate in database pubblici. *ZNF365B*, *C*, *D* non davano alcun segnale per northern analysis ma saggi di RT-PCR mostravano bassi livelli di espressione nel sangue, rene e ghiandola adrenalinica. In particolare, il trascritto *ZNF365D* era espresso nel sangue ad un livello 10 volte minore dell'espressione del gene GAPDH in un esperimento di real-time PCR.

Un allele specifico *ZNF365D* con una struttura alterata

Sono stati sequenziati tutti gli esoni di *ZNF365* e parte delle regioni introniche, da otto pazienti selezionati con l'aplotipo a rischio. Sono state identificate due varianti che causano un missenso nell'esone 5 (trascritto *ZNF365A*) con una sostituzione serina/alanina (variante Ser337Ala) e nell'esone 12 (trascritto *ZNF365D*) con una sostituzione alanina/treonina (variante Ala62Thr) (Figura 3). Inoltre sono stati

identificati diversi polimorfismi nelle regioni UTR e nelle regioni introniche del gene.

E' stata effettuata un'analisi per verificare se la presenza di questi alleli conferisca un rischio aumentato di nefrolitiasi da acido urico. Un confronto delle frequenze alleliche in pazienti UAN e in controlli ha mostrato una forte associazione tra UAN e la variante Ala62Thr (valore $p=0.0096$; valore p empirico= 0.0052). Quando le frequenze degli aplotipi sono state confrontate in casi e in controlli comprendenti le varianti identificate, si osservava un'aumentata evidenza dell'associazione con UAN per diverse configurazioni di aplotipi ($p\text{-value}=0.0205$; $p\text{-value}=0.0239$; $p\text{-value}=0.0280$; $p\text{-value}=0.0306$) (Figura 5).

Un'analisi bioinformatica predice che la variazione ala62thr induce un'alterazione della struttura secondaria della proteina ZNF365D, alla terza ansa ad alfa elica (Figura 6). Questi risultati suggeriscono che l'effetto della treonina causa un cambio conformazionale significativo che può avere importanti implicazioni sulla funzione biologica della proteina e/o sulle sue interazioni con altre proteine.

BIBLIOGRAFIA

Angius A, et al. (2001) Archival, demographic and genetic studies define a Sardinian sub-isolate as a suitable model for mapping complex traits. Hum Genet 109:198-209

- Baggio B (1999) Genetic and dietary factors in idiopathic calcium nephrolithiasis: what do we have, what do we need? *J Nephrol* 12:371-374
- Berger B, et al (1995) Predicting Coiled Coils by Use of Pairwise Residue Correlations. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8259-8263.
- Bourgain C, et al (2000) Search for multifactorial genes in founder populations. *Ann Hum Genet* 64: 255-265
- Burgess AW, Ponnuswamy PK, Scheraga HA (1974) Analysis of conformations of aminoacid residues and prediction of backbone topography in proteins. *Isr J Chem* 12: 239-286.
- Chou P, Fasman GD (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their aminoacid sequence. *Adv Enzymol* 47:45-148.
- Cserzo M, et al (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* 10: 673-676
- Curhan GC, et al (1997) Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol* 8:1568-1573
- Daly MJ, et al (2001) High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 29:229-232
- Dufton MJ, Hider, RC (1977) Snake toxin secondary structure predictions: structure activity relationships. *J Mol Biol* 115:117-193.
- Enomoto A, et al (2002) Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417: 447 - 452

- Fu Q, et al (2000) Molecular cloning, expression characterization, and mapping of a novel putative inhibitor of rho GTPase activity, RTKN, to D2S145-D2S286. *Genomics* 328-332
- Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol* 120:97-120.
- Goldstein AM, et al (2001) A common founder for the V126D CDKN2A mutation in seven North American melanomaprone families. *Br J Cancer* 85:527-530
- Hedrick PW (1987) Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. *Genetics* 117:331-341
- Hofmann K and Stoffel W (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374,166
- Jaeger P (1996) Genetic versus environmental factors in renal stone disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5:342-346
- Jeffreys AJ, Ritchie A, Neumann R (2000) High resolution analysis of haplotype diversity and meiotic crossover in the human TAP2 recombination hotspot. *Hum Mol Genet* 9: 725-733
- Kruglyak L, Daly MJ, Lander ES (1995) Rapid multipoint linkage analysis of recessive traits in nuclear families, including homozygosity mapping. *Am J Hum Genet* 56:519-527
- Lahoud MH, et al (2001) Gene targeting of Desrt, a novel ARID class DNA-binding protein, causes growth retardation and abnormal development of reproductive organs. *Genome Res* 11(8): 1327-1334



- Laity JH, Lee BM, Wright PE (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* 11:39-46
- Lim V I (1974) Algorithms for prediction of alpha-helical and beta-structural regions in globular proteins. *J Mol Biol* 88:873-894.
- Lupas A, Van Dyke M, Stock J (1991) Predicting Coiled Coils from Protein Sequences *Science* 252:1162-1164.
- Kruglyak L (1997) What is significant in whole-genome linkage disequilibrium studies? *Am J Hum Genet* 61: 810-812
- Malashkevich VN, et al (1996) The crystal structure of a five-stranded coiled coil in COMP: a prototype ion channel? *Science* 274:761-765
- Nagano K. (1977) Logical analysis of the mechanism of protein folding. IV Supersecondary structures. *J. Mol. Biol.* 109:235-250.
- Nagase T, et al (1998) Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. XII. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro. *DNA Research* 5: 355-364
- Ombra MN, et al (2001) Identification of a new candidate locus for uric acid nephrolithiasis. *Am J Hum Genet* 68: 1119-29
- Pasquier C, Hamodrakas SJ (1999) An hierarchical artificial neural network system for the classification of transmembrane proteins. *Protein Eng* 12: 631-634
- Patil N, et al (2001) Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science* 294:1719-1723

- Peltonen_L, Palotie A, Lange K (2000) Use of population isolates for mapping complex traits. *Nat Genet* 1: 182-90
- Persson B, Argos P. (1996) Topology prediction of membrane proteins. *Protein Sci* 5: 363-371
- Ristaldi MS, et al (1989) Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia in Mediterranean populations by dot blot analysis with DNA amplification and allele specific oligonucleotide probes. *Prenat Diagn* 9(9):629-38
- Rivers K, Shetty S, Menon M (2000) When and how to evaluate a patient with nephrolithiasis. *Urol Clin North Am* 27: 203-213
- Roch-Ramel F, Guisan B (1999) Renal transport of urate in humans. *News Physiol Sci* 14: 80-84
- Scheinman SJ (1999) Nephrolithiasis. *Semin Nephrol* 19:381-388
- Serio A, Fraioli A (1999) Epidemiology of nephrolithiasis. *Nephron Suppl* 81:26-30
- Sobel E, Lange K (1996) Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am J Hum Genet* 58:1323-1337
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM (2002) Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* 3: 391-397
- Terwilliger JD (1995) A powerful likelihood method for the analysis of linkage disequilibrium between trait loci and one or more polymorphic marker loci. *Am J Hum Genet* 56:777-787
- Terwilliger JD, et al (1998) Mapping in small populations with no demographic expansion. *Hum Hered* 48:138-154

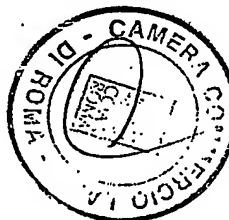
von Heijne G (1992) Membrane Protein Structure Prediction, Hydrophobicity Analysis and the Positive-inside Rule. J Mol Biol 225: 487-494

Wright AF, Carothers AD, Pirastu M (1999) Population choice in mapping genes for complex diseases. Nat Genet 23:397-404

Wu X, Lee CC, Muzny DM, Caskey CT (1989) Urate oxidase: Primary structure and evolutionary implications. Proc Natl Acad Sci USA 86, 9412-9416

Wu X, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT (1992) Two independent mutational events in the loss of urate oxidase. J Mol Evol 34, 78-84.

Olga Capasso
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)



RIVENDICAZIONI

1. Acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene *ZNF365* umano in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale di almeno una delle proteine del gruppo *ZNF365* per uso diagnostico di patologie correlate alla calcolosi renale.
2. Acido nucleico comprendente almeno un frammento del gene *ZNF365* umano in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale di almeno una delle proteine del gruppo *ZNF365* per uso terapeutico di patologie correlate alla calcolosi renale.
3. Metodo per evidenziare in un soggetto almeno una mutazione nel gene codificante per una delle proteine del gruppo *ZNF365* umano, localizzato sul cromosoma 10, comprendente le fasi di:
 - prelevare un campione contenente una quantità sufficiente di DNA da detto soggetto o in grado di essere riprodotto in coltura;
 - isolare il DNA da detto campione;
 - sottoporre detto DNA ad amplificazione esponenziale utilizzando come coppia di inneschi per la reazione di amplificazione almeno due oligonucleotidi in grado di amplificare almeno un frammento del gene *ZNF365* umano, in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale di almeno una delle proteine del gruppo *ZNF365*;
 - evidenziare in almeno un frammento amplificato eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale.
4. Metodo secondo la rivendicazione 3 in cui la fase di amplificazione esponenziale del DNA viene effettuata utilizzando coppie di inneschi



per la reazione di amplificazione in grado di amplificare una parte della porzione codificante del gene *ZNF365* umano.

5. Metodo secondo la rivendicazione 4 in cui la fase di amplificazione esponenziale del DNA per amplificare una parte della porzione codificante del gene *ZNF365* umano comprende l'uso delle seguenti coppie di inneschi:

Ala62Thr-F: 5' CTC CAC TCC ACC TTT TTA AG 3'

Ala62Thr-R: 5' GCT GAC ATT GGT ACT TAC TG 3'

6. Metodo secondo le rivendicazioni da 3 a 5 in cui la fase di evidenziare in almeno un frammento amplificato eventuali mutazioni rispetto ad un controllo da soggetto normale avviene per sequenza diretta.
7. Kit diagnostico per patologie correlate alla calcolosi renale per attuare il metodo secondo le rivendicazioni da 3 a 6 comprendente:
 - almeno una coppia di oligonucleotidi innesco per la reazione di amplificazione esponenziale di almeno un frammento del gene *ZNF365* umano, in cui detto frammento codifica per una porzione funzionale di almeno una delle proteine del gruppo *ZNF365*;
 - un DNA di controllo da soggetto non affetto da patologie correlate alla calcolosi renale.
8. Kit secondo la rivendicazione 7 in cui le coppie di oligonucleotidi innesco per la reazione di amplificazione sono in grado di amplificare una parte della regione codificante del gene *ZNF365*.

9. Proteina appartenente al gruppo delle proteine ZNF365 o porzione funzionale di essa per uso diagnostico di patologie correlate alla calcolosi renale.
10. Proteina appartenente al gruppo delle proteine ZNF365 o porzione funzionale di essa per uso terapeutico di patologie correlate alla calcolosi renale.

Roma,

p.p.: SHARDNA S.p.A.

DE SIMONE & PARTNERS S.p.A. (OC)

Olga Capasso
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)



RM 2002 A 0005 25'

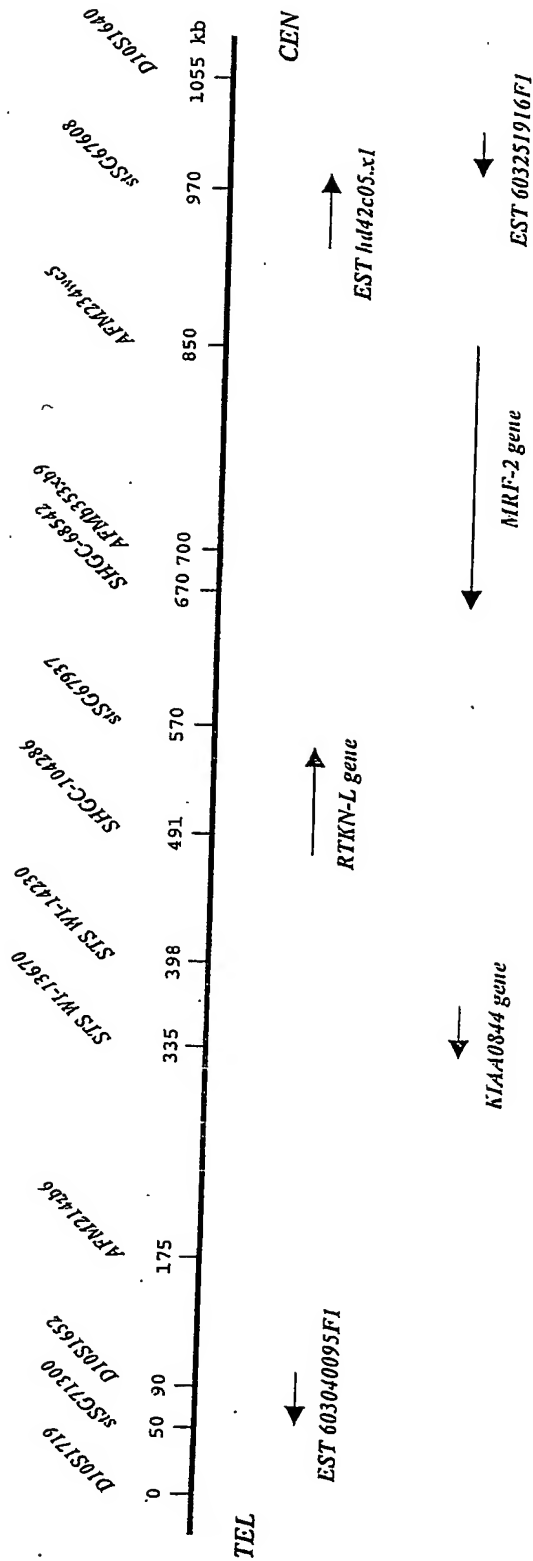
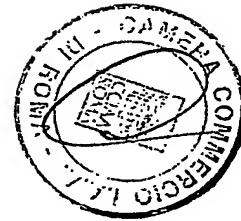
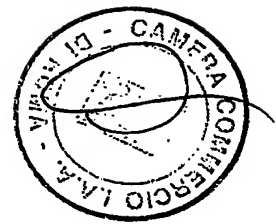


Figura I



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)
Olga Capasso

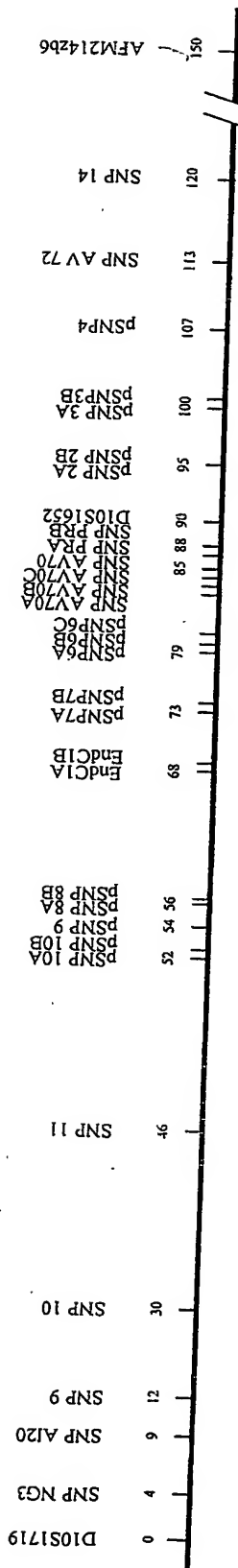
RM 2002 A 0005 251



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

Figura 2.



C2H2 domain

ZNF365A
ZNF365B
ZNF365C

MOQKAFESRYPWQESFENVAVCLPLRCPCGDHTRFRSLSIRAHIEFSHSYEERTLLTKCSLFPSPSLKOTDLVTSSELKPKCKLQSSGNVVKQKPSYVN 100
MOQKAFESRYPWQESFENVAVCLPLRCPCGDHTRFRSLSIRAHIEFSHSYEERTLLTKCSLFPSPSLKOTDLVTSSELKPKCKLQSSGNVVKQKPSYVN 100
MOQKAFESRYPWQESFENVAVCLPLRCPCGDHTRFRSLSIRAHIEFSHSYEERTLLTKCSLFPSPSLKOTDLVTSSELKPKCKLQSSGNVVKQKPSYVN 100

ZNF365A
ZNF365B
ZNF365C

LYSISHEHSKDKPFEWAERPVSXVQTYTAMDLDGTRSGPGLPTSDTKASFEAHVREKFNRMVEAVDRTIEKRIDKLTKELAQKTAELLEVRAA 200
LYSISHEHSKDKPFEWAERPVSXVQTYTAMDLDGTRSGPGLPTSDTKASFEAHVREKFNRMVEAVDRTIEKRIDKLTKELAQKTAELLEVRAA 200
LYSISHEHSKDKPFEWAERPVSXVQTYTAMDLDGTRSGPGLPTSDTKASFEAHVREKFNRMVEAVDRTIEKRIDKLTKELAQKTAELLEVRAA 200

coil

region

ZNF365A
ZNF365B
ZNF365C
ZNF365D

FVQLTQKKQEVQRRERALNRQVDVAVEMIAVLRQLTSESEELLRKKEEVVTFNHFIEAAAEKEVOGKARLQDFIENLLQRVELAEKQLEYYSQQASGF 300
FVQLTQKKQEVQRRERALNRQVDVAVEMIAVLRQLTSESEELLRKKEEVVTFNHFIEAAAEKEVOGKARLQDFIENLLQRVELAEKQLEYYSQQASGF 300
FVQLTQKKQEVQRRERALNRQVDVAVEMIAVLRQLTSESEELLRKKEEVVTFNHFIEAAAEKEVOGKARLQDFIENLLQRVELAEKQLEYYSQQASGF 300
MSALGQITITVSRWCWNTERNQTDKNPCLHGAYLQLRRTVKNKSTHLKKPLMKQA 54

ZNF365A
ZNF365B
ZNF365C
ZNF365D

VRDLSGHVLTDISSNRKPKLSRGPHSVNCNHPDLKSHFHPKGRNHLKKAADDRASMQPAKAIHEQAESSRDLCRPPKKGELGFGKGNIRPKMAKKKP 400
VRDLSGHVSWMKGAGAPVIVCQNDLEESAIVE Transmembrane 333
VRDLSGHVSWMKGAGAPVIVCQNDLEESAIVE Transmembrane 333
PPWKDLAFQPLHPAERKTQVWRWQSGNSSDLETTSSASPPWPTGSNRDVVINTLAESCCGLSELITAPPYAGVSIQGPSQIWLFPFCGGTFHHNEKDVIL 400
PPWKDLAFQPLHPAERKTQVWRWQSGNSSDLETTSSASPPWPTGSNRDVVINTLAESCCGLSELITAPPYAGVSIQGPSQIWLFPFCGGTFHHNEKDVIL 154

ZNF365A
ZNF365C
ZNF365D

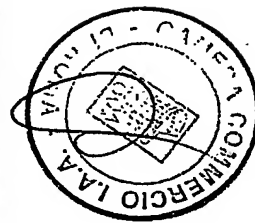
TAIVNII 407
GLQDFERESVTSQSRNISLITLGOLQNCVIGKLTIDLLTEHLLGVRRHGVICFPWGLPSSS 462
GLQDFERESVTSQSRNISLITLGOLQNCVIGKLTIDLLTEHLLGVRRHGVICFPWGLPSSS 216



Figura 4

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

2002 A 000525



UN MANDATARIO
per se e per altri
per se e per altri
per se e per altri
per se e per altri

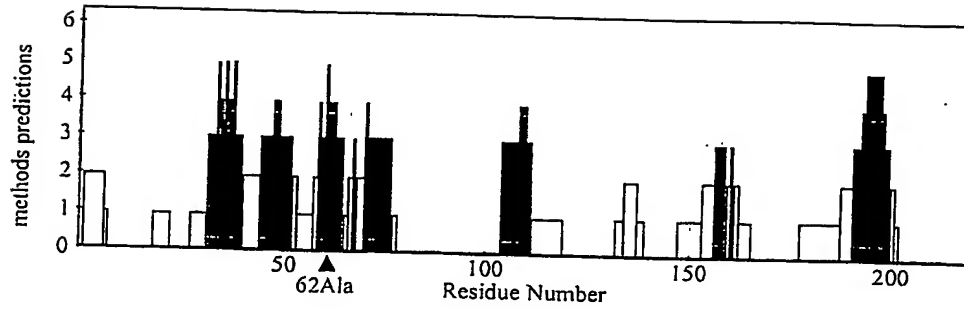
Marcatore	D10S1719	SNP NG3	SNP 9	SNP 10	SNP 11	Ala62Thr	SNP AV70	D10S1652	PSNP 3A	SNP AV72	SNP 14	AFM214zb6	SNP N	SNP 1	SNP 7	AFM234wc5	D10S1640
Posizione (Kb)	-	4	12	30	46	83	85	90	100	113	120	175	216	260	527	850	1055
val. p ^a	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,0123	n.s.	0,0006	0,0123	n.s.	n.s.	0,0213	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
val. p ^b empirico	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,0085	n.s.	0,0004	0,0073	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
val. p ^c	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,0096	n.s.	0,0009	0,0145	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
val. p ^d empirico	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,0051	n.s.	0,0031	0,0075	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
val. p ^e empirico (analisi aplo tipo)	0,0205																
	0,0239																
	0,0306																
	0,0280																

Figura 5

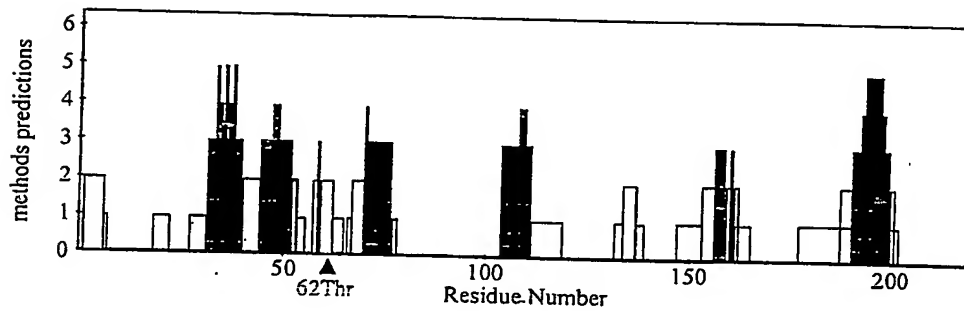
2002 A 000525



A



B



RM 2002 A 0005 25

Figura 6



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'Iscri. 820 B)

Olga Capasso

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.